

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-29425

(43)公開日 平成8年(1996)2月2日

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>  
G 0 1 N 33/553  
B 0 3 C 1/00  
1/28  
C 1 2 M 1/34

識別記号 A  
Z  
B

F I

技術表示箇所

審査請求 有 請求項の数10 O.L (全7頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平7-149086  
(22)出願日 平成7年(1995)6月15日  
(31)優先権主張番号 P 4 4 2 1 0 5 8. 2  
(32)優先日 1994年6月16日  
(33)優先権主張国 ドイツ(DE)

(71)出願人 591005589  
ベーリンガー・マンハイム・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンクテル・ハフツング  
BOEHRINGER MANNHEIM GESELLSCHAFT MIT BE SCHRANKTER HAFTUNG  
ドイツ連邦共和国、68305 マンハイム、  
ザントホーファー シュトラーセ 116  
(74)代理人 弁理士 朝日奈 宗太 (外3名)

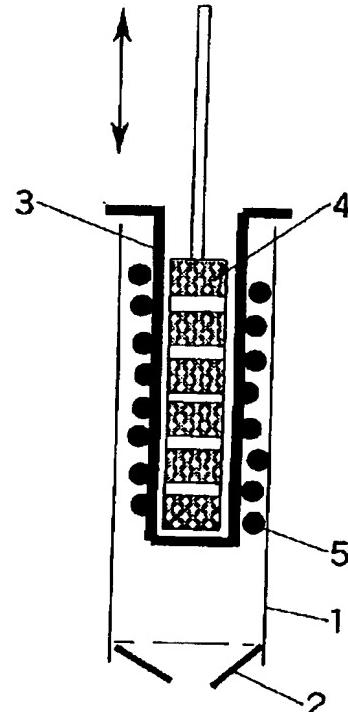
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 液体中の被検成分を磁気的に分離する方法

(57)【要約】

【構成】 液体中の1つの被検成分を他の成分から分離するための方法ならびに該方法を実施するための装置であり、該装置が液体を受けるための1つまたは数個の容器、該容器の中に達しうる1つまたは数個の保護スリーブ、該保護スリーブおよび容器の中に達しうる磁気デバイス、ならびに該保護スリーブおよび磁気デバイスを前記容器中に導入しかつ引き出すための手段からなる装置。

【効果】 本発明の方法および装置を用いることにより、被検成分の固定に必要な装置の部材を汚染から保護し、該被検成分が固定されている磁性粒子を効率よく分離することができる。



(2)

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 (a) 液体中の1つの被検成分を容器中に懸濁している磁性粒子上に固定し、(b) 該磁気デバイスを前記容器中に浸し、該磁気デバイスが磁性を有さない材料からなる保護スリーブによって容器中の液体から隔てられている、(c) 固定されていない他の成分を取り除く液体中の1つの被検成分を他の成分から分離する方法。

【請求項2】 前記磁気デバイスが、磁極を交互にしてサンドイッチ状に配置されている数個の永久磁石または電磁石を有する請求項1記載の方法。

【請求項3】 被検成分が細胞である請求項1または2記載の方法。

【請求項4】 被検成分が核酸である請求項1記載の方法。

【請求項5】 前記工程(c)に統いて、前記磁性粒子が前記磁気デバイスを回転および／または昇降させることにより再び懸濁される請求項1記載の方法。

【請求項6】 請求項1ないし5のいずれかの方法にしたがって液体中の1つの被検成分を他の成分から分離し、ついで検出する液体中の1つの成分の検出方法。

【請求項7】 液体中の1つの被検成分を他の成分から分離するための装置であつて、液体を受けるための1つまたは数個の容器、該容器の中に達しうる1つまたは数個の保護スリーブ、該保護スリーブおよび容器の中に達しうる磁気デバイス、ならびに該保護スリーブおよび磁気デバイスを前記容器中に導入し、かつ引き出すための手段からなる装置。

【請求項8】 前記磁気デバイスが小さい棒状の磁石または電磁石のサンドイッチ状の配列を有する請求項7記載の装置。

【請求項9】 前記保護スリーブが前記容器に対して蓋の形状を有する請求項7記載の装置。

【請求項10】 再懸濁のために追加の磁石を前記容器の外側に有する請求項7記載の装置。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、液体中の1つの被検成分を該液体中の他の成分から分離する手段および該手段を実施するための装置に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 液体中の被検成分、とくに体液中の構成成分を分析するとき、該液体が、該被検成分をごく微量しか含んでいないという問題、および該被検成分に非常に類似した成分を数種類含んでいるという問題がたびたび生じている。この理由により、この被検成分の実際の検出は、該被検成分の増幅または精製工程によって進められる。一般的に用いられている方法は、前記被検成分を固相に選択的に固定する方法で、結果として類似する成分を含む液体は分離される。ついで、固定された被検

(2)

2

成分はそのまま固相において、または別の液体中に移したのち検出される。使用される固相は、吸収性のフリース (absorbent fleeces)、容器の壁面 (container walls) または粒子状の相 (particle-like phases) である。

【0003】 最近、磁気を有する、または磁化しうる材料が固相として高く評価されてきている。なぜなら、懸濁するという該材料の性能により、前記被検成分の該材料の表面への固定が充分に迅速なものとなるからである。

一方、磁界を前記材料にかけることにより、前記材料は周りの液体から迅速に分離されうる。欧州特許出願公開第0589636号明細書は磁性粒子 (magnetic particles) を磁気的に分離する方法についての実施例を記載している。この方法では、前記粒子を含む容器があるデバイスに組み込まれ、前記容器がその低い部分の付近に1個または数個の棒磁石を配しているため、磁性粒子が前記容器の内壁の低い部分に集められる。

【0004】 國際公開第92/04961号パンフレットは、磁化しうるワイヤーを浸すことによって外部からはたらく磁気力を増大させる方法を記載している。磁性粒子は該ワイヤーに保持される。結果として、該ワイヤーは容器から取り除かれて洗浄され、ついで該ワイヤー上に固定された成分量が検出されうる。

【0005】 欧州特許出願公開第0339980号明細書もまた磁性粒子を周囲の液体から分離する方法を記載しており、ピペットの外側に取り付けられた磁石が、磁性粒子をピペットの内側に配されているワイヤーに固定するため用いられている。固定した粒子を洗浄したのち、該粒子は該ワイヤーの振動により再び懸濁される。

【0006】 欧州特許出願公開第0265244号明細書は、磁性粒子に被検物質を捕捉する方法および該磁性粒子を供試物質を含む液体から取り除く方法を記載している。

【0007】 磁石または角の鋭い (sharp-edged) フェライトの効果を増大させるために一体化された (integrated) スチールウールを備えた、フィルターの形状を有するデバイスを用いることより、細胞の分離も達成される。

## 【0008】

【発明が解決しようとする課題】 試験管を移動しなければならない (国際公開第93/25912号パンフレット) または磁石を反応容器に向けて動かさなければならぬため、これらの方法は自動操作にはほとんど適さない。国際公開第92/16844号パンフレットはこのプロセスの自動操作の可能性を記載しているが、再懸濁が不充分である一方で汚染の危険性をかなり含んでいる。このばかり、磁石も反応容器の外側に配されていく。

50

【0009】現在までに開示された方法の欠点は、複雑で、かつしばしば効率のわるい再懸濁の手順を必要とする事である。ワイヤーが一度サンプル液に浸されると、容器には再使用できないのである。

【0010】本発明の目的は、磁性粒子が効率的な方法で分離され、かつ固定に必要な装置の部品が汚染から保護されている方法を提供することである。

#### 【0011】

【課題を解決するための手段】本発明は、液体中の1つの被検成分を磁性を有して容器中に懸濁している粒子に固定し、永久的に磁気を有するデバイス (permanently magnetic device) を容器中に浸し、該デバイスは液体から隔てるための保護スリーブを備えており、ついで固定されていない他の成分を取り除くことによって液体中の該第1の被検成分を他の成分から分離する方法に関する。本発明はまた、前記被検成分の検出方法および該方法を実施するための装置に関する。

#### 【0012】

【作用および実施例】本明細書において、液体はとくに臨床分析に用いられるものが好ましい。とくに、血液、血清、血漿、リンパ液、便、唾液または尿だけではなくそれらから誘導される液体などのような体液を含む。誘導液 (derived liquids) は、試薬を加えることまたは個々の成分を取り除くことによって調製されたものである。これらの液体中の成分は、たとえば抗体、抗原、ハプテンなどの免疫学的に活性な物質、また、たとえば対応する身体の細胞からの核酸、該身体に侵入したウイルスまたはバクテリアなどの生物体、および、たとえばリンパ球などの身体の免疫システムの細胞などのような分析的に重要性のある化学物質である。これらの被検成分はすべて、該成分との差異がごくわずかである他の成分と混じって前記液体の中に存在する。

【0013】本発明による装置は、核酸分析のためのサンプル調製によく適合する。

【0014】本発明の方法において、分離される被検成分と、該成分が磁性粒子と結合するための反応パートナー (partner) との相互作用は公知の方法で行なわれる。このような相互作用は被検成分に依存している。とくに適した相互作用は、抗体と抗原のあいだの免疫学的反応、および核酸が本質的に相補性の核酸とハイブリダイズするという傾向である。磁性粒子を用いる自動化された反応は、米国特許第4233169号明細書、国際公開第83/03920号パンフレット、米国特許第3970518号明細書または米国特許第4672040号明細書を含め、異なる種々の技術において公知である。前記明細書およびパンフレットに記載の、ある被検成分を液体から固定するための条件は、本発明にも適用されうる。

【0015】容器は、液体だけでなく該液体中に含まれ

る成分をも含んでいる容器であると解される。そして、たとえば試験管、キュベットまたはエッペンドルフ管のような底部が閉じている容器であってもよい。本発明によれば、底部が開いている容器であってもよい。これらの容器は、ガラスまたはプラスチック、好ましくはポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリカーボネートもしくはポリウレタンなどの磁気を有さない (non-magnetic)、および磁化することのない (non-magnetizable) 材料からなる。

10 好ましい様式では、この容器の容量は50μlと10mlのあいだ、とくに好ましくは200μlと2mlのあいだである。好ましい容器の形は本質的に円筒状で、長さが内径よりも大きいものである。

【0016】磁性粒子は、とくに、磁場によって引き寄せられる微粒子である。したがって、磁性粒子はそれ自体が磁化しうる。残留磁気が非常に小さい材料が好ましい。前記粒子の材料は磁気的に引き寄せられる部分を含むマトリックスなどのような複合材料であってもよい。磁気的に引き寄せられる材料は、たとえば、鉄、酸化

20 鉄、ニッケル、コバルトまたは酸化クロムなどでよい。前記マトリックスは様々な材料、たとえば有機または無機ポリマーから作られてもよい。前記磁性粒子は分離される被検成分の結合パートナーでコーティングされる。磁性粒子の製造だけでなく、免疫学的に活性な物質、または核酸と共有結合をつくるもので該磁性粒子をコーティングすることは、たとえば米国特許第4297337号明細書またはドイツ特許出願公開第3014036号明細書に記載の従来技術において知られている。このような磁性粒子は、たとえばダイナル (Dynal) およびローヌープーラン (Rhône-Poulenc) などにより、市販のものを入手することもできる。ローヌープーランの粒子は比較的安定な懸濁を形成するため、本発明の方法において使用するのに好ましい。さらに磁性粒子の一般的な直径は、十分の数μmないし数μmである。

30 【0017】本発明の第1の工程においては、被検成分を含む液体に磁性粒子を接触させる。インキュベーションのあいだ、該粒子は好ましくは懸濁している。該粒子の表面と分離される被検成分の相互作用の結果、該成分は該粒子上に固定される。この反応工程は前記の容器のうちの1つの容器の中で行なわれる。

40 【0018】充分な量の、分離される被検成分が前記粒子上に固定されたなら、本発明においては磁気デバイスを前記容器中に浸すことが提案される。少なくとも該デバイスの一部は液面の下に達すべきである。本発明によれば、該デバイスは磁性を有さない材料からなる保護スリーブによって液体から隔てられている。この保護スリーブは、たとえばプラスチックでつくられる。前記デバイスおよび保護スリーブは主に2つの異なる方法で浸されうる。第1の実施態様においては、まず保護スリーブ

が容器中の液体に浸され、したがって該保護スリーブによって形成される空洞部が液面の下に達する。このばあい、該保護スリーブが容器に対して蓋のような形状を有していてもよく、手動または自動で上方から前記容器上に配置されうる。続く工程では前記磁気デバイスが上方から蓋の空洞部に挿入され、該デバイスの少なくとも一部が液面の下に位置する。

【0019】前記デバイスは、主に、永久的に磁気を有するデバイス、または、たとえば電磁気デバイスなどのような磁化しうるデバイスであってもよい。もし、該デバイスが永久的に磁気を有するデバイスであるならば、該デバイスの挿入後、懸濁している粒子が液体と保護スリーブの界面に移動し、ついでそこに沈着する。前記デバイスが、たとえば電磁石のような磁化しうるものであるばあい、この沈着は磁場が該デバイスにかけられたのちに生ずる。

【0020】必要または望むなら、前記粒子は、容器の外部に磁場をかけることによって保護スリーブから取り除かれ、かつ再び懸濁する。続いて保護スリーブの表面で別の沈着がおこる。本発明の次の工程においては、保護スリーブの表面に付着している前記粒子から固定されていない成分を含む液体が取り除かれる。これは、たとえば該液体を吸い取るまたは（容器がピペット状なら）排出することにより、従来の方法によって行なわれうる。しかし、前記磁気デバイスを保護スリーブおよび固定されている磁性粒子とともに液体から取り除くことも可能である。吸い取りおよび排出することが好ましい。

【0021】多くのばあい、他の成分を含む残りの液体が、固定された粒子に付着している。このためにつぎの処理が妨げられるなら、洗浄することによって前記磁性粒子に対する他の成分の付着を取り除いてもよい。そのためには、保護スリーブおよび磁性粒子とともに前記デバイスを洗浄液に浸すこと、磁化を解除または磁気デバイスを取り除くことによって磁性粒子の固定を解くこと、または容器の外側に配置されている磁石を前記粒子を引き寄せるために用いることが考えられる。ついで、磁気デバイスを再び挿入することまたは磁場をかけることによって、磁性粒子は再び保護スリーブに固定される。前記サンプル液の吸い取りおよび排出と同様に、洗浄液も取り除かれうる。

【0022】1つの実施態様において、本発明の装置は、磁性粒子を第1の容器中の反応混合物から別の容器に移すためにも用いられる。このことは他の公知の方法では容易にはできない。

【0023】本発明の方法は磁性粒子の再懸濁がとくに効率的であるという事実によって特徴づけられる。実験によると、保護スリーブが液体中にまだ浸されているあいだに磁気デバイスをゆっくりと該保護スリーブから引き出すばあい、容器の外側に配置されている磁石によって該デバイスを取り除くばあいに比べて、よりよい再懸

濁がおこる。保護スリーブから磁気デバイスを引き出す速度は0.1～50mm/secのあいだで、とくに好みしくは0.5～10mm/secのあいだである。これらの速度は、自動ピペットアーム（p i p e t t i n g a r m）のXYZアームに取り付けられている昇降装置（l i f t i n g d e v i c e）による単純な方法において達成される。

【0024】精製された被検成分には、つづいてつぎの処理、たとえば検出反応が行なわれる。この目的のため10にいくつかの方法が従来技術として当業者に知られている。つぎの処理を行なうために、前記被検成分が磁性粒子から（核酸のばあい脱ハイブリダイゼーションによって）解放され、ついで該粒子から分離される。

【0025】したがって本発明は、本発明にしたがって液体中の1つの被検成分を分離すること、ついで該成分を検出することによる被検成分の検出方法にも関する。

【0026】さらに本発明は、液体を受けるための1つもしくは数個の容器、該容器中に達する1つもしくは数個の保護スリーブ、該保護スリーブおよび容器中に達する磁気デバイス、ならびに該保護スリーブおよび磁気デバイスを前記容器中に導入し、かつ再び引き出すための昇降装置からなる、液体中の1つの被検成分を他の成分から分離するための装置に関する。該容器および保護スリーブはマガジン（m a g a z i n e s）に蓄えられてもよい。磁性粒子が分離されうるときには、すぐに保護スリーブがマガジンから取り出され、昇降装置よって磁気デバイスと別々に、または一緒に容器中に導入される。該昇降装置は、たとえばテカン（T e c a n）製のロボットなどのようなピペットロボット（p i p e t t i n g r o b o t）のXYZアームに取り付けられる。

【0027】好ましい方法においては、本発明の磁気デバイスは小さい棒磁石からなるサンドイッチ状の配列を有する。磁極は昇降の方向に関して交互に配置される（図1）。

【0028】また、欧州特許出願公開第0136126号明細書に記載されているように個々の棒磁石からなる配列を有することも可能である。しかし、容器の外側に配置することは不可能である。好ましい実施態様（図402）においては、棒磁石が同一の磁極が互いに面するよう垂直方向に配置されている。とくに好ましい方法においては、個々の棒磁石が小さなスチール製の板で隔てられている。電磁石を用いる実施態様においては、これらの磁石は複数段、1つづつ水平方向に角度を変えながら配列される。その結果磁極は上方からみれば星状の配列を有する。これによって磁性粒子の沈着が一様になることが保証される。このばあい、さらに回転しうる昇降装置を備えることが好ましい。

【0029】本発明の装置においては、磁気デバイスに50加えて第2の、またはさらに別の磁石が備えられ、それ

らは容器の外側に配置される。これらは磁性粒子を再懸濁するために有効に用いられる。

【0030】とくに有効な実施態様においては、液体の容量だけではなく容器および保護スリーブの形状ならびに容量が適宜に適合している。とくに好ましい方法においては、保護スリーブの外表面が容器の内表面からおよそ等しい距離で常に隔てられているように保護スリーブの形状が選択される。このような配置の実施態様では、一方が他方の内側に位置しているという2つの円筒状の形状を有する。2つの壁によって形成される空間は液体によって満たされうる。これは、保護スリーブを容器に挿入するに先立って、容器中に満たされた液体量がこの容量を越えてはならないということを示す。保護スリーブが容器中に導入されたとき、液体は円筒状の壁のあいだに押し込められる。

【0031】保護スリーブを導入することによって該保護スリーブと容器とのあいだに形成される空間がサンプル液で満たされる実施態様においては、電磁気デバイスを用いることがとくに好ましい。磁気デバイスの周囲に液体を比較的薄層状に分散させることにより、電磁石を用いたときの磁場の強さが充分なものになる。従来の技術にしたがう配置において、このことは達成されていない。

【0032】さらに、保護スリーブは、好ましくは該保護スリーブを容器から取り除くための手段を含む。これは、好ましくは該保護スリーブの内側の部分に含まれる部材であり、そこに前記昇降装置が取り付けられる。

【0033】本発明の方法は自動化しやすいという利点を有する。さらに、再懸濁が簡単かつ効率的になされるという利点もある。驚くことに、引き寄せられた磁性粒子は、磁石の昇降および回転の動きを通じ、とくに効率的に再懸濁される。このことは、とくに磁気デバイスがゆっくりと上下に動くときに達成される。さらに、保護スリーブを用いることにより、汚染の危険性が大きく減少することが保証される。この危険性は、エアロゾルを含むばかり、および核酸の増幅につながる細胞の分離において大きくなる。この目的のため、保護スリーブは使い捨ての部材として設計されてもよく、容器の蓋としても役立つ二重の機能を満たしてもよい。小さい棒磁石の層状構造により、磁性粒子が広範囲のエリアにわたって沈着し、ゆえに洗浄および再懸濁が容易になる。

【0034】図1に示す実施態様は、保護スリーブ3が導入され、開口ゴムシール弁(open rubber sealing lip)2を備えたプラスチック容器1を表わしている。該保護スリーブは、たとえば6つの棒磁石からなる、磁気デバイス4を包含する。この型のプラスチック容器は射出成形法によって製造されうる。該プラスチック容器は、本質的に円筒状の母体を有 \*

\* し、かつ少なくとも2つの孔を備えた底部を有する。前記開口ゴムシール弁は、好ましくは、プラスチック容器の底部の孔と一致しない開口を備えるゴムの円板の形状を有する。低い圧力が前記容器の底部にかけられたとき、前記開口ゴムシール弁は底部から引っ込められ、かつ液体が底部の孔を通して出ていく。磁性粒子5は保護スリーブの外側の壁に比較的一様に分布している。

【0035】図2に示す実施態様は、6つの棒磁石が該棒磁石の磁極が交互になるように配置されている磁気デバイスを表わしている。

【0036】図3に示す実施態様は、前記磁気デバイス4が保護スリーブから取り除かれたあとの保護スリーブおよび磁性粒子5を備えた容器を表わしており、ついで該容器の壁の外側に取り付けられている追加の磁石によって磁性粒子が取り除かれうる。

【0037】図4に示す実施態様は保護スリーブの縦断面図を表わしており、容器から該保護スリーブを取り除くための手段6が内部に配置されている。

【0038】図5に示す実施態様は本発明にしたがう装置を表わしており、容器がピペット状の先端を有している。

【0039】図6に示す実施態様は移動の際の磁性粒子の損失を防ぐためにサイホンの形状を有する実施態様を表わす。

#### 【0040】

【発明の効果】本発明の方法および該方法を実施するための装置によれば、液体中の1つの被検成分を磁性を有して容器中に懸濁している粒子に固定し、磁性を有するデバイスを容器中に浸し、該デバイスは液体から隔てられるための保護スリーブを備えており、ついで固定されていない他の成分を取り除くことによって液体中の該被検成分を他の成分から効率よく分離されうる。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の1つの実施態様の概略縦断面図である。

【図2】本発明の別の実施態様の概略縦断面図である。

【図3】本発明のさらに別の実施態様の概略縦断面図である。

【図4】本発明の別の実施態様の概略縦断面図である。

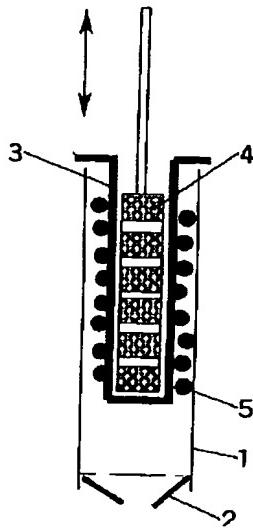
【図5】本発明の別の実施態様の概略縦断面図である。

【図6】本発明の別の実施態様の概略縦断面図である。

#### 【符号の説明】

- 1 容器
- 2 開口ゴムシール弁
- 3 保護スリーブ
- 4 磁気デバイス
- 5 磁性粒子

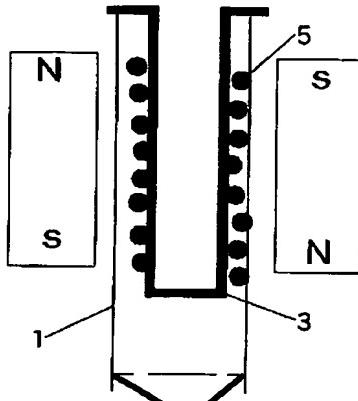
【図1】



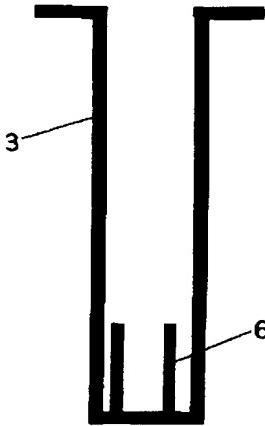
【図2】



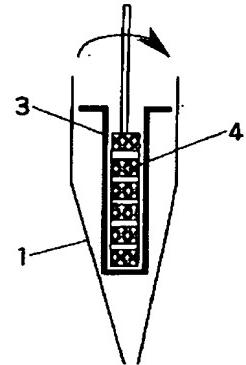
【図3】



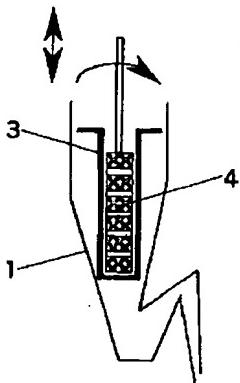
【図4】



【図5】



【図6】



## 【手続補正書】

【提出日】平成7年6月21日

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

## 【補正内容】

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 (a) 液体中の1つの被検成分を容器中に懸濁している磁性粒子上に固定し、(b) 該磁気デバイスを前記容器中に浸し、該磁気デバイスが磁性を有さない材料からなる保護スリーブによって容器中の液体から隔てられている、(c) 固定されていない他の成分を

取り除く液体中の1つの被検成分を他の成分から分離する方法。

【請求項2】 前記工程(c)に続いて、前記磁性粒子が前記磁気デバイスを回転および/または昇降させることにより再び懸濁される請求項1記載の方法。

【請求項3】 液体中の1つの被検成分を他の成分から分離するための装置であって、液体を受けるための1つまたは数個の容器、該容器の中に達しうる1つまたは数個の保護スリーブ、該保護スリーブおよび容器の中に達しうる磁気デバイス、ならびに該保護スリーブおよび磁気デバイスを前記容器中に導入し、かつ引き出すための手段からなる装置。

## フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>	識別記号	府内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q	1/04	6807-4B		
G 0 1 N	33/543	5 8 5		
	33/58	A		
// C 1 2 Q	1/68	Z 9453-4B		

(72) 発明者 ゲルハルト ピーンハウス  
ドイツ連邦共和国、デー-82407 ヴィー  
レンバッハ、カルヴェンデルシュトラーセ  
1

(72) 発明者 プルクハルト シュトルツ  
ドイツ連邦共和国、デー-82386 フグル  
フィング、リンデンシュトラーセ 4  
(72) 発明者 ウルリッヒ シューベルト  
ドイツ連邦共和国、デー-82319 シュタ  
ルンペルク、ハンフェルダー シュトラ  
セ 31ア一